

肿瘤抑制基因 p16 研究进展

高志安¹综述,张世羽²,杨光华²审校

关键词:基因; p16; 肿瘤

中图分类号:R730.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2003)01-0070-03

0 引言

肿瘤的发生发展是多种基因参与的复杂过程,包括癌基因的异常激活和肿瘤抑制基因失活,在过去的十几年里,已有 100 余种癌基因和 10 余种肿瘤抑制基因被分离鉴定,新近分离鉴定的一个重要的肿瘤抑制基因 p16 (CDKN2、MTS1、INK4I)在许多肿瘤细胞株中存在高频率的缺失和突变^[1,2],体外培养细胞 p16cDNA 转染实验证明该基因有抑制细胞克隆形成的作用^[3]。p16 蛋白直接参与细胞周期的调节,是细胞 G1 期重要的负调节蛋白,随着研究的广泛开展,对 p16 基因及其与肿瘤关系的认识也越加深入,本文就 p16 基因的研究进展作一综述:

1 p16 基因的结构

Skolnick 等^[4]于 1992 年提出在 9 号染色体短臂 21-22 区 (9p²¹⁻²²) 可能存在一个家族性黑色素瘤易感基因-MLM, 并发现该区不到 100kb 范围出现缺失, 该区缺失在许多其它肿瘤细胞株中也相继得到证实, 这一现象提示该区可能存在至少一个肿瘤抑制基因。Kamb 等^[1]测得该区有两个独特的序列, 其中一个与先前冷泉港实验室报告^[5]的一种周期素依赖激酶 (cyclin-dependentkinase4, CDK4) 抑制因子-p16 蛋白的编码基因序列相似, 因其在许多肿瘤细胞株中缺失, 遂将其命名为多肿瘤抑制基因-MTS1 (multiple tumorsuppressor1)。另一序列与 MTS1 相毗邻, 并且与 MTS1 有很大同源性, 被命名为 MTS2。经过与基因组 DNA 序列详细比较, 发现该基因包含 p16 蛋白的全部编码序列。两个内含子将编码序列分为三个部分: 第一外显子由 126bp 构成, 第二外显子含 307bp, 这两个外显子构成 97% 的编码序列, 第三外显子仅 11bp。p16 基因的编码产物为 148 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量为 15.845 道尔顿, 故称 p16 蛋白。p16 蛋白含有四个独特的锚蛋白 (ankyrin) 重复结构, 该结构与其抑制活性有关。新近研究结果表明, p16 基因具有更为复杂的结构和转录调节机制。

Stone 等^[6]发现 p16 基因两种不同形式的转录产物, 一种 DNA 序列与 p16 基因序列相同, 称为 形式, 另一种含有与 p16 基因相同的外显子 2 和外显子 3 序列, 但却含有一个与 p16 基因不同的外显子 1 序列, 称为 形式, 由于外显子 1 不同, 将这两个外显子 1 分别称为 E1 和 E1', E1' cDNA 有一个比 E1 更大的开放阅读框, 理论上可编码一个由 180 个氨基酸组成的蛋白质。研究结果^[7]还提示 p16 基因两种不同形式的转录可能有不同的调节机制, 其转录可能分别起始于两个不同的启动子-P 和 P', 或是由一个启动子启动转录, 然后由不同的剪接方式产生两种不同的转录产物。

2 p16 蛋白与细胞周期调节

细胞周期调节依赖于一系列大分子蛋白质有序的活化与失活, 以维持细胞的增殖和分化, 保证机体的正常生长发育。周期素 (cyclins) 和周期素依赖激酶 (cyclin-dependentkinases, CDKs) 促进细胞周期进展; 而周期素依赖激酶抑制因子 (cyclin-dependentkinaseinhibitors, CKIs) 则抑制细胞周期进程。CDK 依赖其相应的 cyclin 配体使其激活, 促进细胞增殖, 而 CKI 通过抑制 CDK 的活性, 抑制细胞增殖。近年来研究结果表明, 在细胞周期调节机制中, 存在一些控制细胞周期进程的 checkpoints, 而细胞周期相关蛋白的调节作用都集中在这些检查点上。目前认为有两个检查点对整个细胞周期进程至关重要, 一是 G1/S 检查点, 另一个是 G2/M 检查点, 分别控制 DNA 复制和细胞的有丝分裂, 而 G1/S 检查点的调节更具重要性, 细胞一旦通过 G1/S 转换进入 S 期, 便可顺利完成 DNA 复制并容易通过其它检查点而完成有丝分裂。

参与细胞周期 G1/S 转换调节的 CDK 至少有 5 种, 其中已明确起重要作用的是 CDK4 和 CDK6。参与此点调节的周期素有 cyclinD 和 E, 其中 cyclinD1 的作用更强。p16 蛋白最初被认为是 CDK4 特异性抑制蛋白^[5]。在体外经 SV40T 抗原转化的细胞中, p16 蛋白与 cyclinD1 竞争结合 cdk4 并抑制其活性。目前证实 p16 蛋白以同样方式抑制 cdk6 的活性。正常情况下 p16 蛋白水平在 g1 晚期达高峰, 这可能与

收稿日期:2001-02-20; 修回日期:2001-03-20

作者单位:1.100036 北京肿瘤医院病理科;2. 华西医科大学病理学教研室

rb 蛋白功能状态有关。人类 cyclinD1-CDK4/CDK6 复合物在 G1 期的作用底物是 Rb 蛋白。Rb 蛋白分子量为 110Kd, 是一种核磷蛋白, 通过磷酸化和去磷酸化调节其功能状态。

p16 蛋白调节细胞周期的可能途径是: 在 G1 晚期 cyclinD1 水平升高, 进而结合 CDK4 和/或 CDK6 并使其活化, 促使 Rb 蛋白磷酸化, 转录活化因子 E2F 与 Rb 蛋白分离, 刺激细胞增殖。而 p16 蛋白与 cyclinD1 竞争结合 CDK4 和 CDK6, 使其失活, 阻止 Rb 蛋白磷酸化, 抑制细胞增殖。研究结果显示, 在细胞周期 G1/S 转换的调节中, p16 蛋白的功能与 Rb 蛋白的功能状态有关。Medema 等^[8]发现在有野生型 Rb 蛋白存在的细胞株中, G1 期细胞群明显增加而 S 期细胞群减少。在缺乏功能型 Rb 蛋白细胞中, p16 蛋白对细胞增殖的抑制作用减弱。提示在 g1/s 转换调节中, p16 蛋白对细胞增殖的抑制作用至少部分依赖于 Rb 蛋白功能的正常。

3 p16 基因异常与肿瘤的关系

肿瘤抑制基因的一个重要标志是其在肿瘤中出现高频率的缺失和突变。其失活主要有两种方式: 一种是基因大片段缺失, 包括单等位基因的杂合性缺失 (Heterozygous deletion) 和双等位基因的纯合性缺失 (Homozygous deletion)。一般认为杂合性缺失后剩余的另一个等位基因常发生突变。另一种是基因内突变, 突变的方式可以是单个碱基替换, 也可以是单个碱基或几个碱基缺失以及碱基插入。突变多发生在外显子。研究结果显示 p16 基因第二外显子是突变好发部位, DNA 序列分析表明, 常见的碱基突变有 G-A、T-C 转换和 G-T 颠换。突变对基因编码功能的影响有下列几种情况: 一是碱基突变产生终止密码, 使转录提前终止; 另一种情况是突变的基因表达无功能的 mRNA, 使 mRNA 不能转译成蛋白质; 再有就是基因突变产生一种不能与 CDK 结合的蛋白, 或虽然与 CDK 结合, 但其半衰期明显缩短, 而影响蛋白质的稳定性。

p16 基因在许多类型肿瘤中出现高频率的缺失和突变。Kamb 等^[1]检测 290 个肿瘤细胞株, 发现 133 个细胞株出现 p16 基因缺失, 其中肺癌和白血病细胞株基因缺失率为 25%, 在胶质瘤突变率为 85%。在乳腺癌和头颈部癌细胞株突变率分别为 60% 和 30%^[2], 但在某些肿瘤如结肠癌和神经母细胞瘤却未检测到 p16 基因缺失和突变。

近年来研究结果表明 DNA 甲基化可能是 p16 基因失活的另一个重要机制^[9,10]。DNA 甲基化是在胞嘧啶 5'-位羟基上加上一个甲基基团, 是 DNA 复制后的酶促反应过程。目前已发现真核生物细胞中

普遍存在 DNA 甲基转移酶, DNA 甲基化是真核细胞常见的基因修饰过程, 是真核细胞基因表达的复杂调控机制之一。甲基化可引起 DNA 构型及其稳定性的改变, 当高度甲基化时, 基因表达受抑制。甲基化一般发生在胞嘧啶 (C) 和鸟嘌呤 (G) 比较集中的部位, 这种 C 和 G 相对集中的部位被称为 CpG 岛 (CpG island)。研究表明, p16 基因外显子 1 启动子富含 CpG 结构, 且常见该部位甲基化, 这一启动子部位的甲基化可能抑制了启动子的活化, 导致 p16 基因转录失活。有报道指出 33% 的乳腺癌, 60% 的前列腺癌和 25% 的肾癌存在 p16 基因高度甲基化, 92% 结肠癌细胞株和 40% 原发结肠癌中 p16 基因 DNA 呈高度甲基化。用去甲基化剂处理 p16 基因结构未见异常但无基因转录且 DNA 呈高度甲基化状态的结肠癌细胞株, 发现用去甲基化剂处理后的细胞株重新表达 p16 mRNA。表明 DNA 甲基化是 p16 基因失活原因之一。

4 问题与展望

细胞周期调节蛋白的发现使肿瘤发生学的研究与细胞周期调控机制有机的联系在一起, 是肿瘤研究工作的一大进展, 尤其是 p16 作为肿瘤抑制基因直接参与细胞周期调节, 这对研究肿瘤发生机制将很有帮助。但 p16 基因在肿瘤发生中的作用仍有许多问题没有很好解决, 例如肿瘤细胞株与实体肿瘤之间基因异常的差异; 有些肿瘤尚未发现 p16 基因异常; p16 基因与其它原癌基因及肿瘤抑制基因的关系以及 DNA 甲基化与基因失活及其调节等问题尚需大量研究来阐明。相信经过努力, 彻底阐明细胞周期调节机制将有助于揭示肿瘤发生机制。

参考文献:

- [1] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. Cell cycle regulator p16^{INK4} is a potential tumor suppressor in human cancer. *Science*, 1994, 264 (5157): 436-440.
- [2] Nobori T, Miura K, Wu D J, et al. Deletion of the p16^{INK4} gene in multiple human cancers. *Nature*, 1994, 368 (6473): 753-756.
- [3] Okamoto A, Demetrick DJ, Sillman EA, et al. Mutation and overexpression of p16 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 (23): 11045-11049.
- [4] Skolnick MH, Lew G, Travis J, et al. Cloning of a p16^{INK4} gene in melanoma and its susceptibility to mutation. *Science*, 1992, 258 (5085): 1080-1081.
- [5] Serrano M, Hannon G J, Beach D, et al. A new regulatory motif in cell cycle control: a specific inhibitor of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993, 366 (6456): 704-707.
- [6] Stone S, Jian G P, Dhanasekaran P, et al. Complex structure and regulation of p16 (MTS1) locus. *Cancer Res*, 1995, 55 (14): 2988-2994.
- [7] Mao L, Merlo A, Bedi G, et al. A novel p16^{INK4a} transcript. *Cancer Res*, 1995, 55 (14): 2995-2996.
- [8] Medema RH, Herrera RE, Lam H, et al. Growth suppression by p16^{INK4}

p16re quiresfunctionalretinoblastoma protein[J].ProcNatAcad Sci USA,1995,92 (14) :6289-6293.

[9] LeeTL,Leun gWK,ChanMW,etal.Detectionof gene promoter hypermethylationinthetumorandserumof patientswith gastric carcinoma[J].ClinCancerRes,2002,8 (6) :1761-1766.

[10] BianYS,OsterheldMC,FontollietC,etal. p16inactivationby methylationoftheCDKN2A promoteroccursearly duringneoplastic progressioninBarrett 'sesophagus[J].Gastroenterology, 2002,22 (4) :1113-1121. (李奇明校对)

论著摘要

p-gp、bcl-2 和 bax 蛋白在人脑胶质瘤中的表达

方胜¹,袁先厚²,裴永恩¹,王国安³

关键词:脑胶质瘤;p-gp;bax;bcl-2
 中图分类号:R739.41 文献标识码:D
 文章编号:1000-8578(2003)01-0072-01

本组收集 1997 年 3 月~1998 年 3 月 63 例脑胶质瘤石蜡标本,利用 S-P 免疫组化方法,检测其 p-gp、bcl-2、bax 蛋白表达,并探讨临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 63 例脑胶质瘤发病年龄 7~69 岁,平均 37.2 岁。男性 41 例,女 22 例。包括原发性星形细胞瘤 Ⅱ级 12 例,Ⅲ级 23 例,Ⅳ级 20 例。手术化疗后复发性星形细胞瘤 Ⅱ级 4 例,Ⅲ级 3 例,Ⅳ级 1 例。Ⅱ级星形细胞瘤以纤维型为主,Ⅲ级星形细胞瘤主要为间变型,Ⅳ级为多形性胶质母细胞瘤。JSB-1 p-gp 抗体、bax 抗体和 bcl-2 抗体均购自福州迈新公司,为即用型。

1.2 方法 免疫组化方法详细步骤按迈新公司提供的 S-P 试剂盒说明进行。结果判定:(1) p-gp 结果判断:瘤细胞中 p-gp 表达位于胞浆内,呈棕黄色。阳性细胞不均匀,呈散或灶性分布。表达分 3 级:(-)无阳性细胞或阳性细胞 <5 个,且着色较淡者为阴性;(+)阳性细胞 >5 个,但 >30% 为阳性;((+))阳性细胞 >30%,且着色强者为强阳性。bax 和 bcl-2 结果判断:瘤细胞中 bax、bcl-2 蛋白的表达位于胞膜或胞浆内,呈棕黄色。阳性细胞不均匀,呈散在或灶性分布。按照大于 5% 以上胞质呈棕黄色者为 bax 和 bcl-2 蛋白阳性。表达分 4 级:(-)无着色或与背景色无差别;(+)仅

有 <25% 癌细胞明显阳性,或大多数癌细胞轻度阳性;((+)) :26% ~ 50% 癌细胞明显阳性;(((+))) :>51% 癌细胞明显阳性。统计学处理用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 p-gp 的表达 63 例星形细胞瘤 p-gp 阳性率为 39.68%, 其中 8 例复发胶质瘤再次手术前化疗病例,阳性表达率 87.5% (7/8),提示化疗与未化疗肿瘤 p-gp 表达存在显著性差异($\chi^2=6.5537, P<0.025$)。肿瘤病理分级 Ⅱ级胶质瘤 p-gp 阳性表达率 25%, Ⅲ级 38.46%, Ⅳ级 52.39%, ($\chi^2=47.6162, P<0.005$)。5 例正常脑组织 p-gp 表达均阴性。

2.2 bcl-2 和 bax 蛋白的表达 63 例中 34 例 bcl-2 阳性,约 53.97%。其中 Ⅱ级 31.25%, Ⅲ级 50%, Ⅳ级 76.19%, $\chi^2=7.6671, P<0.05$ 。而 5 例正常脑组织中 bcl-2 均表达阴性。63 例中 31 例 bax 表达阳性,约 49.21%, 其中 Ⅱ级 37.5%, Ⅲ级 53.83%, Ⅳ级 52.38%, $\chi^2=1.1824, P<0.5$ 。5 例正常脑组织中 bax 均表达阴性。

2.3 复发性星形细胞瘤的 p-gp、bcl-2 与 bax 蛋白表达 8 例复发性星形细胞瘤中 p-gp、bcl-2 阳性表达均为 7/8 (87.5%), bax 阳性表达 3/8 (37.5%)。与原发星形细胞瘤的 p-gp、bcl-2、bax 表达比较,p-gp 增加、 $P<0.025$;bcl-2 增加、 $P<0.05$; bax 减低不明显、 $P>0.05$ 。原发星形细胞瘤 bcl-2/bax 阳性表达比率为 0.

9643, 复发性星形细胞瘤 bcl-2/bax 阳性表达率比值为 2.3333, 复发性

星形细胞瘤 bcl-2/bax 比值增高。

3 讨论

肿瘤细胞对化疗药物的敏感性是脑胶质瘤术后化疗效果的主要因素。Abe 等发现胶质瘤化疗后较化疗前 MRP 和 p-gp 阳性表达率均增高,认为 MRP 和 p-gp 表达是获得性的或原发性的。kiwit 观察在胶质细胞恶变过程中,伴有 p53、myras 等癌基因被激活的同时,mdr1 即被激活。mdr1mRNA 异常活化,p-gp 表达增多,这是导致首次化疗失败的部分原因。

本实验显示 5 例正常脑组织无 p-gp 表达;8 例曾进行化疗的复发性胶质瘤 p-gp 阳性表达率为 7/8 (87.5%),明显高于未进行化疗的肿瘤 p-gp 阳性表达率(39.68%), $P<0.025$ 。提示脑胶质瘤既有原发性耐药又可能产生化疗诱导或增强肿瘤细胞耐药性的双重因素。分化程度高的肿瘤 p-gp 表达量明显低于分化程度差的肿瘤, $P<0.005$ 。

随着细胞凋亡因子和化疗诱导肿瘤细胞凋亡研究的深入。Mpqake 等发现 bax 与化疗的敏感性或耐药性有密切关系,而与 bcl-2、bcl-XL、bcl-XS、bak、Mcl-1 无关。Weller 等也提出除 bax 与化疗敏感性有关外,与 p53、p21、MDM2、bcl-2 无关。Hara 等提出 bax 蛋白表达减少,是脑胶质瘤转移和肿瘤生长所必需的。本组研究表明,正常脑组织无 bcl-2、bax 表达。bcl-2 表达随星形细胞瘤恶性程度的增加而增加, $P>0.05$ 。而 bax 表达与星形细胞瘤恶性程度无关, $P>0.05$ 。Kaluza 等提出在肿瘤细胞中,bcl-2 强表达,而 bax 弱表达是肿瘤复发的可靠根源。本组研究 8 例复发性星形细胞瘤中,p-gp 表达和 bcl-2 表达 87.5%,bax 阳性表达 37.5%, bcl-2/bax 比值较原发星形细胞瘤明显增大。提示胶质瘤中 p-gp 和 bcl-2 强表达,bax 弱表达,bcl-2/bax 增大是预示肿瘤复发的指标。(贺文校对)

收稿日期:2002-04-25;修回日期:2002-06-17
 基金项目:湖北省 2000 年重点指令性计划资助项目(2002p1508)
 作者单位:1.435000 黄石市中心医院神经外科;2. 武汉大学中南医院神经外科;3. 武汉大学人民医院神经外科

